

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

⑨ 日本国特許庁 (JP)

⑩ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報 (A)

昭58—38216

⑪ Int. Cl. ³	識別記号	庁内整理番号	⑬ 公開 昭和58年(1983)3月5日
A 61 K 35/14		7138—4C	
37/04		7138—4C	発明の数 4
37/22		7138—4C	審査請求 未請求
37/475		7138—4C	
37/547		7138—4C	
37/64		7138—4C	
// A 61 K 31/43		6408—4C	
35/16		7138—4C ※	(全 9 頁)

⑭ 濃縮血漿誘導体

グ36番地

⑯ 特 願 昭57—83355

⑰ 出 願 人 セラファルム・ミカエル・スト
ロートマン

⑱ 出 願 昭57(1982)5月19日

優先権主張 ⑲ 1981年6月25日 ⑳ 西ドイツ
(DE)㉑ P 3124962.0

西ドイツ国4400ミュンスター・
カイザー・ウイヘルム・リン
グ36番地

㉒ 発 明 者 ミカエル・ストロートマン
西ドイツ国4400ミュンスター・
カイザー・ウイヘルム・リン

㉓ 代 理 人 弁理士 三宅正夫 外1名
最終頁に続く

明 細 書

1. 発明の名称

濃縮血漿誘導体

2. 特許請求の範囲

(1) 止血の促進と傷口閉止の最適制御のための生化学的基質の形をもち、構成成分が内因的及び／又は外因的血液凝固システムを最も活性化しうる如く、且つ生理学的、或は、もし適用可能ならば、病理学的現象の複雑性を考慮に入れて選択され、又その成分がすべて粉末状で与えられていることを特徴とする濃縮血漿誘導体。

(2) 主たる構成成分としてフィブリノーゲン、トロンビン、プロトロンビン複合体成分、及びプロテアーゼ抑制剤を含むことを特徴とする特許請求の範囲第(1)項に記載の血漿誘導体。

(3) 更に血小板抽出物、抗生物質、其他同様の物質、の混合物を含むことを特徴とする特許請求の範囲第(1)又は(2)項に記載の血漿誘導体。

(4) 傷口の閉止と治癒を促すための濃縮血漿誘導体にして、60～96重量%のフィブリノーゲ

ンを含み、0.5～5重量%のフィブリン溶解抑制剤を含むものにおいて、

a) フィブリノーゲンは冷時不溶グロブリンを殆んど含まないこと、

b) 濃縮血漿誘導体に更に0.1～1.5重量%のトロンビン及び／又はプロトロンビンを含むこと、

c) すべての成分が56℃以下の温度で生物学的に活性ある固体粉末状の形態をとること、および

d) 之等の固体成分が互いに混合されていること、

を特徴とする濃縮血漿誘導体。

(5) 該フィブリノーゲンが、人間の血漿からグリシン、β-アラニン、エタノールの混合溶媒を用いて沈澱物を得、これを次いで透析と凍結乾燥を行うことにより得たものであることを特徴とする特許請求の範囲第(4)項に記載の血漿誘導体。

(6) フィブリノーゲンが2重量パーセント以下の冷時不溶グロブリンを含むことを特徴とする特許

請求の範囲第(4)又は(6)項に記載の血漿誘導体。

(7) フィブリン溶解抑制剤が抗プラスミンであることを特徴とする特許請求の範囲第(4)～(6)項に記載の血漿誘導体。

(8) プロトロンビンが少くとも95多^{（プロトロンビン）}トロンビンに変わりうるものであることを特徴とする特許請求の範囲第(4)～(7)項に記載の血漿誘導体。

(9) トロンビンが少く共1,000国際単位/μ^{（国際単位）}の生物活性をもつことを特徴とする特許請求の範囲第(4)～(8)項に記載の血漿誘導体。

(10) トロンビン1重量部当りプロトロンビン0.1～2重量部が与えられることを特徴とする特許請求の範囲第(4)～(9)項に記載の血漿誘導体。

(11) 1～10重量部のトロンビン及び/又はプロトロンビン、0.01～3重量部のフィブリン溶解抑制剤、並びに0.4重量部以下の冷時不溶グロブリンを含むことを特徴とする特許請求の範囲第(4)～(10)項に記載の血漿誘導体。

(12) すべて固体粉末状になつた磷脂質、プロスタグランジン、乾燥安定剤、抗生物質及び/又は膜

固要素をさらに含むことを特徴とする特許請求の範囲第(4)～(11)項に記載の血漿誘導体。

(13) 濃縮血漿誘導体の乾燥粉末状混合物を直接傷口及び手術部位に適用することを特徴とする特許請求の範囲第(1)～(12)項に記載の濃縮血漿誘導体の使用方法。

(14) 濃縮血漿誘導体の粉末状混合物を例えばコラーゲンの如き生物学的担体又は天然又は合成の創傷手当材料に入れることを特徴とする特許請求の範囲第(1)～(12)項に記載の濃縮血漿誘導体の使用方法。

(15) 濃縮血漿誘導体の乾燥粉末状混合物を噴射剤により噴霧化し、スプレーとし、又は発泡せしめることを特徴とする特許請求の範囲第(1)～(12)項に記載の濃縮血漿誘導体の使用方法。

3. 発明の詳細な説明

本発明は止血の促進と傷の防止の最適制御のための生化学的基質の形を持つ濃縮血漿誘導体に関するものである。特に本発明は傷の防止及び治癒を促進するためのかかる血漿誘導体にして、60ないし96重量パーセントのフィブリンノーゲン、

0.05ないし5重量パーセントの纖維素（フィブリン）溶解抑制剤を含むものに関するものである。

血液凝固システムの働きは或種の血漿成分、特に溶存するフィブリンノーゲンから不溶のフィブリンを形成し、之を傷口に沈着せしめることによつて化学的機械的に出血を止めることにある。この止血過程に於いてフィブリンは機械的に、抵抗力ある組織及び血管或は傷口の閉鎖を形成する。他方フィブリン溶解システムや凝固システムの成分と共に、フィブリンは細胞による「組織傷害の修復」の基礎を形成する。

過去10年に於ける研究の結果が示す様に傷口の閉止の生化学的制御は多様な前向き後ろむきの反応や結合を含む多段の触媒過程の連鎖であつて、その間血液凝固要素の制御調整が行われるが、現在までにこういった血液凝固要素としては少く共13種のものが認知されその性質が示されている。血液凝固要素に加えて、或種の磷脂質や凝血細胞の諸要素も重要である。凝血作用そのものは血管内では内皮細胞によつて支えられている。

血液凝固機構の分析的解明、即ち凝固に関与する要素や物質の分離、適当な補助物質の使用或は適当な方法の開発は、創傷の医学的治療に於て止血の促進と傷口閉止の最適制御を可能ならしめるものである。特に近來止血促進のため生体の血漿中から或種の成分を分離し、之を保存し必要に応じ之をフィブリン形成とその交錯に必要な他の物質と共に傷口に適用して止血の制御を達成することが可能となつた。

こういった技術に於て、之までに知られている典型的なシステムは「フィブリン接着力」である。この方法に於ては、まづフィブリンノーゲン溶液が処置の必要な組織部位に適用される。次いで少量の高濃度のトロンビンと第十三要素の溶液が凝血を促すためその上に滴下される。余りに早期の纖維素溶解を避け処置された組織部位の裂開を防ぐため、局部的に纖維素溶解抑制剤が加えられる。しかしこの方法は製剤の分離調整貯蔵並びに他の所要物質の適用等方法が複雑で多くの費用を要する。更に止血の促進を最適の傷口閉止という多様

な要求を満たすのに使用しうる剤の種類は限られている(フィブリノーゲン・トロンビン第十三要素繊維素溶解抑制剤)。また、西独逸の特許出願公開第30 02 933号によれば、ある種の組織接着剤が使用されており、この剤は少量の第十三要素と繊維素溶解抑制剤、例えばアプロティニン、の他に60~98部のフィブリノーゲン0.5~20部の寒冷時不溶グロブリン及び0~15部のアルブミンから成っている。この剤は血漿の冷却沈澱物を緩衝液で一度乃至数度処理して冷時可溶血漿蛋白を分離して得られるものである。かくして得られた精製沈澱物を溶解しその状態で-20℃で保管してもよい。或は溶解した精製沈澱物は冷凍して貯蔵してもよい。冷凍乾燥の後得られた生成物はやはり注射用蒸留水で使用前に再生しなければならず従つて液状で適用される。加えて、トロンビンと塩化カルシウムの混合物を、結合すべき傷口の組織に、フィブリノーゲン溶液と共に或はフィブリノーゲン溶液で処理する前に投与しなければならない。

状の生化学的基質とは即ちフィブリノーゲン、トロンビン、プロトロンビンの組成物の諸要素及びプロテアーゼ抑制剤をすべて乾燥した固体状で含む粉状物である。この粉末状の生化学的基質の組成は生体内外の凝血システムの最適の活性化という観点から、又生理学的或は時によつては病理学的考慮からも選択される。完全に調製を終つた組織接着剤は乾燥した固体成分のみから成っており、この成分は貯蔵安定性が高く、傷口又は手術部位に固体の剤型のまゝ適用しうるものである。

特に本発明は上述の目的の達成のため、傷口閉止と傷の治療を助ける濃縮血漿誘導体を提供するもので、この誘導体は60~96重量パーセントのフィブリノーゲン0.05~5重量部の繊維素溶解抑制剤を含むものであり、こゝに於て

- a) フィブリノーゲンは冷時不溶グロブリンを殆ど含まない、
- b) 血漿誘導体は更に0.1~15重量パーセントのトロンビン及び/又はプロトロンビンを含む、

実際のやり方としては、冷凍したフィブリノーゲン溶液を解氷し、それにトロンビンと塩化カルシウムを加え、粘度上昇によつて重合反応が始まつたことが確認されるまで、混合物をそのままにしておき、それから傷口の組織に適用する。しかしこの方法は使用に適した製剤を調製するための費用、並びに調製した製剤の使用適合期間が短かいこと等から問題がある場合が多い。又之を使用する患者の方も剤が液状を保っている間に使用せねばならず、使用適期を判断する上で困難が伴う。

こういつた点に鑑みて、本発明は、室温で殆ど無限の貯蔵安定性をもち且直接、即ち凝固状態を変えたり他の成分を添加したりすることなく傷口或は手術した個所に適用することが出来る濃縮血漿誘導体の形をとる組織接着剤を提供することを目的としている。

本発明によれば、こういつた目的は止血促進のための粉末状の生化学的基質と傷口閉止のための最適の生化学的制御とによつて達成される。粉末

- c) すべての成分は56℃までは生物活性をもつ固体粉末の形で存在する、

- d) 之等の固形成分は相互に混合しうるものとする。

本発明によるこの濃縮血漿誘導体は実際上殆ど無限の貯蔵安定性を有し、且容易に体液に溶解する。従つて何等追加的措置を施さず傷口閉止に直ちに且直接適用しうるものである。トロンビン及び/又はプロトロンビンの混合物であるため本剤は体液中に部分的に移行しそして/又は体液中に溶解すると急速に重合が始まり、粘稠な接着性のよい傷口閉止物質が形成される。

本発明による粉末状の濃縮血漿誘導体は天然又は合成の担体に添着して使用してもよく、これによつて、凝固促進物質を均一に傷口表面に分布せしめることが出来る。更に本剤は粉末状であるため噴霧・スプレー又は発泡せしめて裂傷部や孔部の閉塞に使用することも出来る。本剤は乾燥した固体粉末状であるため酵素剤やプロエンザイムを濃縮血漿誘導体と組み合わせることによりそれら

を貯蔵するのも特に容易である。

上に述べた既知の方法と対照的に、本発明の方法によれば、人間の血漿から分離されたフィブリノーゲンは殆ど冷時不溶グロブリンを含んで居ないことが確認されている。冷時不溶グロブリンはフィブリン形成を妨げ、傷の治療を遅らせる。粉末状の濃縮血漿誘導体の総重量に対する冷時不溶グロブリンの量は2重量パーセントより少くすべきで、望ましくは0.4重量パーセントより少ないこと、更に最も望ましくは、0.2重量パーセントより少ないことが望まれる。冷時不溶グロブリンの比率が少い程フィブリンの重合開始及び進行は早い。

冷時不溶グロブリンを殆ど含まぬこの様なフィブリノーゲンは人間の血漿からグリシンと β -アラニンとエタノールを含む混合溶剤によつて沈澱せしめ、沈澱物を透析し、冷凍乾燥を行うことによつて得られる。本発明による濃縮プラズマ誘導体はこうして得られるフィブリノーゲンを含むことが望ましい。かかるフィブリノーゲンは分子量 $340,000 \pm 5\%$ をもち、僅かに部分的に α -連鎖

において消化され微細結晶状で存在する。室温ではこのフィブリノーゲンは急速に体液中に溶解し、直ちに、即ち2分以内に重合をはじめる。溶液中で凝固しうるフィブリノーゲンの比率は少く共85パーセントに達する。かかるフィブリノーゲンはやはり生物活性があると旨われる。

本発明による濃縮血漿誘導体は0.05～5重量%の繊維素溶解抑制剤を含んでいる。出来れば1種或は数種の抗プラスミンを繊維素溶解抑制剤として使用するのがよい。之に適した抗プラスミンとしては、例えばアプロテニン、 α_1 -アンチプラスミン及び/又はトリプシン抑制剤があげられる。かかる抗プラスミン剤の添加によつて、既に形成されたフィブリン血栓が再溶解するのを防ぐことが出来る。

本発明の今一つの重要な側面は、濃縮血漿誘導体が固形物とその固形物に直接混合された生物活性をもつフィブリノーゲンと生物活性をもつプロトロンビン及び/又はロンビンを含むことにある。ロンビン及び/又はプロトロンビンの割合

は少く共0.1重量%になる。

その割合が少い時は、フィブリノーゲンの重合は遅れ、又不完全なものとなる。ロンビン及び/又はプロトロンビンの割合が1.5重量パーセントを超えても追加的な効果は無い。したがつて、こうした高価な剤を過剰に入れることは奨められない。ロンビン及び/又はプロトロンビンの割合は1乃至10重量パーセントが望ましい。

既にわかる通り、生物活性を有するロンビンはフィブリン形成のための出発原料として使用され、又フィブリンへの転化のための反応時間を短かくする。本説明に於ては生物活性を有するロンビンとは既知の標準条件下に於けるその活性が少く共1mg当り1000国際単位に達すれば生物活性を有するものと考えらる。

プロトロンビンとは貯蔵安定性があるロンビンの予備であつて粉末が硬固になるとそれからロンビンが形成される。体液中に導入されると、プロトロンビンは少く共95パーセントまでロンビンに変わる。

本発明による濃縮血漿誘導体はロンビン又はプロトロンビンの何れかを含むこともあるが、双方が共存する方が望ましい。最も望ましいのは重量比でロンビン1部に対してプロトロンビンが0.1乃至2部あるのが良い。両者が共存することによつて長期間貯蔵され又高温が作用する環境下でも高い活性が維持される。之は例えば熱帯地方に於ける貯蔵において価値ある特性である。更にロンビンとプロトロンビンの共存は粉末状混合物が湿分を含んだ際、プロトロンビンがロンビンに直接変異するのを促進する。このため傷口で形成される硬固要素例えばXa等もロンビンの形成に寄与し得る。

フィブリノーゲン、ロンビン及び/又はプロトロンビン並びに繊維素溶解抑制剤が固体の粉体として生物活性を有する形で存在するこのシステムは完全な傷口閉止システムを形成しそしてこれは無菌状態下ではどんなに長期に及んでも乾燥状態で保存することが出来、しかも傷口及び手術部位に適用されると、時に体液に含まれた他の成分の

協力を待て部分的に体液の中に移行し、或は体液の中に溶解し、生物学的な活性を示すのである。望ましくは、この濃縮血漿誘導体は微細結晶状の粉末状の混合物を形成し、80~94重量%のフィブリノーゲンを含み、1~10重量%のトロンビン及び/又はプロトロンビンを含み、そして0.01~3重量%の繊維素溶解抑制剤を含み、且つ冷時不溶グロブリンの含有量は全血漿誘導体の重量の0.4%以下であるのがよい。

ここに示された諸成分、即ちフィブリノーゲン、トロンビン及び/又はプロトロンビン並びに繊維素溶解抑制剤はすべて生物活性をもつ固体粉末状剤型をもち、直接直ちに、即ち更に手を加えることなく、患部に適用しうる完全な組織接着剤を構成するものであるが、この血漿誘導体は追加的に他の成分を含んでもよい。

そのためには、望ましくはすべて固体粉末の剤型に於ける磷脂質、プロスタグランジン、乾燥安定剤及び/又は血液凝固要素を使用するのがよい。

之に良く適合する乾燥安定剤は、例えばアルブ

更に、本発明による濃縮血漿誘導体は抗生物質、其他或種の病的状態に対応するに有効な他の添加物を含んでもよい。例えば之等の添加物としてはペニシリン抗ヒスタミン剤、血圧上昇剤、好血性傷口治癒剤としての凝血要素第十三又は第九が含まれる。

傷口の閉止と治癒を促進するための本発明による濃縮血漿誘導体のここに示された諸要素は、商業的に利用可能な制剤又は既知の方法によつて調製したものでよい。本発明を限定するためではなく以下に本発明による濃縮血漿誘導体に不可欠な諸成分の各々を得るためのプロセスを述べる。

人間のフィブリノーゲンを得ること

人間の血漿を4℃まで冷却し、 β -アラニン(エタノールに溶かしした二モル溶液)を攪拌下に加え、更にエタノールをフィブリノーゲン原体が沈殿するまで加える。このフィブリノーゲン原体を遠心分離し、0.01 M. のトリス緩衝液(pH 7.4)中に溶かし更にグリセリ2 Mを加えて再び沈殿を起さしめる。分離した沈殿物を0.9%の食塩水に

ミンやグロブリンであり、後者は例えば商業的に利用可能な α 、 β 、 γ グロブリンの混合物或はアルブミンとグロブリンの混合物等であり、望ましくはアルブミンを使うのがよい。アルブミンの含有量は特に厳密である必要はないが、濃縮血漿誘導体の総重量の35%まで望ましくは15%までがよい。プロスタグランジンの共存は外傷部分の毛細血管床の活動を促進し、又血流中の血小板の活動を高める。血液凝固要素例えば第十三要素血小板抽出物其他血液凝固に必要な諸要素、例えばleucotriene、血小板活性化要素等は止血の促進、傷口の閉塞の最適化という観点から体液中にある諸要素の効果を促進し増大せしめるものである。磷脂質としては、望ましくは人の全血から抽出された血小板を使用する。其他の適した磷脂質としては例えば脳の物質からの抽出物がある。之等の成分は高い特定の効果をもっているため、プロスタグランジン磷脂質凝固要素の総量は、調製を終つた濃縮血漿誘導体の総量に対し1.2重量%以下、望ましくは0.85重量%を超えないのがよい。

溶かし、同溶剤に関して透析を行い、塩分を除き、続いて凍結乾燥する。こうして得られた製剤の平均分子量は340,000である。メルカプトエタノールで還元すると、 α 、 β 、 γ の連鎖がゲル電気泳動によつて充分検出可能となる。分子吸光係数 $E_{280}^{1\text{cm}}$ は16.0である。アルカリ加水分解では吸光増加は12パーセントである。冷時不溶グロブリンの含有量は0.2重量%以下であるが、之は免疫電気泳動又はラジアル免疫分散法によつて検定することが出来る。

又市販のフィブリノーゲン製剤もその調製過程で冷時不溶グロブリンを充分分離したものであれば使用に適する。例えばマルブルグのベーリンググエルケ社が「Human Fibrinogen」という商標名で販売している製剤は使用に適した固体粉末状の人間のフィブリノーゲンである。

トロンビンとプロトロンビンの合剤を得ること

プロトロンビンは市販のプロトロンビン複合物からカラムクロマトグラフィーによつて分離するか、血漿から硫酸バリウムにより抽出し、結晶

化沈澱法により回収することによつて得られる。

又トロンビン及びプロトロンビンは商業的にも市販されている。例えば生物活性が最低3000単位で微細結晶剤型のトロンビンが「Topostasin (トポスタシン)」なる商標名で販売されている(バーデン、グレンツアツハの Hoffman-La Roche 社)、同様にプロトロンビンもウィーンの Immuno AG (インミュノ社) から PPSB 製剤として購入することが出来る。

之等市販の製剤は本発明による濃縮血漿誘導体を調製するために使用することが出来る。

使用に適した粉末状の纖維素溶解抑制剤も市販されている。

例えばアプロチニンはマルブルグのベーリング・ベルケ社から購入可能であり、或いは

トランシロールはレバークーゼンのバイエル社から購入することが出来、或は、 ϵ -アミノカプロン酸はファインケミカル販売専門店で購入することが出来る。

そして又纖維素溶解抑制剤として使用に適する

抗プラスミン剤、即ち α_1 -アンチプラスミンは次の様な方法により得ることが出来る。

α_1 -抗プラスミン(纖維素溶解抑制剤)を得ること

フィブリノーゲンとは「セファローズ」と共有結合してトロンビンによりフィブリンに転化せしめられる。かくして不活性となつたフィブリンは血漿性抗プラスミンの受容体として働き、カラムに血漿が通過すると之と結合し、 ϵ -アミノカプロン酸によつて洗うことができる。又本発明による濃縮血漿誘導体の他の成分として(選択成分)時により使用される他の構成成分も市販されている。即ち固体結晶性アルブミン(例えばマルブルグのベーリング・グエルケ社が販売)、粉末状のプロスタグランジン(例えばミュンヘンのシグマー・ミー株式会社が販売)、並びに微細結晶性の生物活性ある凝固要素(例えばウィーンのイムノ社が販売)等である。

有効な磷脂質は例えば次の様な処方によつて得ることが出来る。

磷脂質を得ること(血小板抽出物)

人の全血から得た沈澱物の「緩衝緩液物」をセラー溶液(グルコースと塩の混合物)で充分洗い赤血球を分離する。この様に調製された白血球-単核細胞-血小板製剤にトライトンXを加えて溶かし、不溶の部分を遠心分離で除き、上澄液をpH 7.4で飽和硫酸により分別沈澱せしめる。沈澱物を遠心分離し透析し乾燥する。この分画の磷脂質含有量はおよそ16~25%に達する。血栓プラスミンテストによる検査の結果、同製剤は凝血活性があることが判る。成長増加は培養基中の繊維形成の増加で検べる。

使用に適した磷脂質を得る今一つの方法は大脳物質をエーテル/クロロホルムで抽出する方法である。

抗生物質等は市販されている製剤でよい。

上述のすべての製剤は室温で固体であり、又56℃までは固体であり実質的に微細結晶性である。本発明による濃縮血漿誘導体は簡単な乾式混合によつて得られる。

即ち混合はボールミル中で約10分間処理することで行われる。或は混合は超音波処理及び篩による分別によつて行うことが出来る。

何れの場合も、構成成分の均一な混合物から乾燥した自由に流れる粉末状物が得られる。以下に本発明による製剤の組成物を例によつて示す。

実施例1

傷口の閉止と治癒を促進せしめる濃縮血漿誘導体にして次の成分から成るもの。

9.0グラムの人のフィブリノーゲン(上述の方法により得られたもの)。

0.5グラムのトロンビン(マルブルグ、ベーリング・グエルケ社製生理活性最低1mg当り3000国際単位)。

0.5グラムのトランシロール(纖維素溶解抑制剤として、レバークーゼンのバイエル社製)。

0.7グラムの磷脂質(上述の方法により得られたもの)。

8.3グラムのアルブミン(乾燥安定剤として、マルブルグ・ベーリング・グエルケ社製)。

上述の固体の粉末状材料をボールミルに入れ10分間破砕する。得られた均一な自由に流れる粉末は例えばX線、ガンマ線3 KW 照射による滅菌処理後直接傷口又は手術部位に対し止血及び傷口の閉止治癒促進のための濃縮血漿誘導体として適用することが出来る。

濃縮血漿誘導体のトロンビン活性のテスト

実施例1による乾燥粉末状混合物を0.9%食塩水1ミリリットル当たり同混合物が0.5mgの割合で溶かし、この溶液100 μ Lを色原体基質(ストックホルムのカピビトラム社のB2222)の標準溶液によつてテストした。終点分析に於て405nmに於ける吸光増加は少く共0.001国際単位 of トロンビン活性に相当する。このシステムは既知のトロンビンで校正してあるので、その間の諸数値を知るのは容易である。

この場合、精度は0.0025~0.003単位であつた。1単位は1mgの標準フィブリノーゲン溶液を15秒以内に凝固させる力をもつ。

フィブリンのからまりの度合のテスト

は最早や0.1%モノクロル酢酸中には溶解しなかつた。

実施例2

粉末状の濃縮血漿誘導体の製剤は実施例1と実質的に同様のものであつた。更に大脳物質から得た磷脂質0.5%とペニシリン5000単位を実施例1に示した割合で実施例1の諸成分に加えた。

混合は実施例1と同様に行つた。

乾燥粉末状混合物10mgを急速攪拌下に5mMのCaCl₂を含む0.9%食塩水中に溶かした。懸濁物中でフィブリンの形成が開始するのは混濁度の測定によつて判定出来る。

ゲル電気泳動を行つてフィブリノーゲンオリゴマーを検出する。粉末状物質の溶解はフィブリンの形成と符合するので、観察中の製剤のゲル化をフィブリン形成の測定の手がかりとすることが出来る。

大脳物質から得た磷脂質の添加は血流の凝固を促進する。製剤は80~90秒で溶解する。

実施例3

粉末状混合物の製剤は実質的に実施例1と同様

トロンビンによつて形成されたフィブリンの凝塊を直ちに0.9%の食塩水で充分洗滌した上で0.1%のモノクロル酢酸中に溶解した。280nmに於ける吸光値を参考値として用いた、一定の時間間隔を置いて本製剤からとり出した凝塊は溶解度が落ちる。その吸光値をゼロ値と比較する。

30分後37℃で形成されたフィブリンは特定の溶液中には最早や検出出来なかつた。

濃縮血漿誘導体の凝固作用のテスト

実施例1による乾燥粉末状混合物の10mgを攪拌下に5mMのCaCl₂を含む0.9%食塩水中に溶解した。本溶液の凝固活性をフィブリン形成率によつて測定した。この目的のためのサンプルは一定の時間々隔を置いて採取しそのフィブリノーゲンとフィブリノーゲンオリゴマーについて電気泳動的に検定を行つた。選択された条件下では、凝固時間は70~90秒で約35%のフィブリノーゲンがフィブリンモノマーに変化していた。本製剤中に含まれる第十三要素によるフィブリンフィラメントのからまりは30分で終了した。其後は本製剤

であつた。但し実施例1と異なり65%の人間のフィブリノーゲン、14.0%のアルブミン、18.7%のグロブリン分画(マルブルグのベーリング・エルケ社製)を実施例1のその他の諸成分と実施例1に示した比率で混合した。

得られた乾燥粉末状混合物の10mgをCaCl₂を含む0.9%食塩水に溶解した。

フィブリン形成が見られるのはやや遅れ、(凝固時間90~120秒)形成されたゲルはより柔かかつた。弾力性があるためにこのフィブリンのケーキは、特に筋力や収縮力等による高い機械的ストレスを受ける傷害部位に適用することが出来る。例えば手足の皮膚の深い傷や腱の切断に於て裂開部をコラーゲン繊維が出て来た後フィブリンポリマーの液化粉体で合せておくことが出来る。

実施例4

粉末状混合物の製剤は実質的に実施例1に同じであつた。但し実施例1と違つて96%の人間のフィブリノーゲンと22.9%のアルブミンを実施例1のその他の成分と実施例1に示した比率で混合

した。この血漿誘導体から形成されたフィブリン凝塊は、より固く少く共より弾性に乏しく、且非常に圧力に対して安定であつた。その高いフィブリン濃度（凝固時間50～70秒）により傷口の閉止が促進されるので、本傷口閉止用粉末製剤は毛細血管からの血の逸出速度の早い比較的血の激しい外傷や、血管の裂傷や皮膚の傷害に使用することが出来る。

実施例5

傷の閉止や治療を助ける濃縮血漿誘導体にして次の様な諸成分から成るもの、85重量%のフィブリンノーゲン（2重量%以下の寒冷時不溶グロブリンを含む市販の製剤マルブルグペーリンググーグ社製）、4重量%のトロンビン（バーアンのグレンザツクのホフマンラロツシュ社の「トボスタシン」活性：少く共々当り3000国際単位）、5重量%のプロトロンビン（PP8B製剤、ウィーンのインミューノ社製）、1重量%の纖維素溶解抑制剤即ち α_1 -抗プラスミン（上述の様に調整）と α_2 -マクログロブリン（マルブルグのペーリン

グーグエルグ社製）の1：1の混合物、2重量%の脳物質から得た磷脂質、（之を得るためには髄膜を牛又は豚の脳組織から除き組織を洗滌し血液を取のぞき凍結乾燥し粉碎し、得られた粉末状物質はクロロフォルム／エーテルで抽出し抽出物を蒸発により濃縮し得られた残滓を砕いて使用した）、3重量%のグロブリン分画（ α -、 β -、 γ -グロブリン混合物、マンハイムのペーリンガー社製）。

トロンビン活性、フィブリンのからまり、及び凝固活性については実施例2、3、4及び5による濃縮血漿誘導体は実施例1について得られた上述の結果と同様の結果を示した。

既に上に述べた様に、乾燥した粉末状混合物の形で濃縮血漿誘導体は通常の滅菌処理をした後、閉止せんとする組織部位、或は止血せんとする出血部位に直接適用することが出来る。この目的のためには粉末状製剤を湿つた適用部位にふりかける様にする。或は粉末状の濃縮血漿誘導体を応急包帯の中に入れておいてもよい。

今一つの使用法は粉末状混合物を例えばコラ

ーゲンの様な生物学的担体材料又は合成又は天然の創傷手当材料中に入れ濃縮血漿誘導体の入つたかゝる担体又は創傷手当材料を使用することである。例えば乾燥した粉末状混合物を滅菌したガスのジェット噴流により吸収ガーゼにふきつけてもよい。粉末状の粉体は創傷手当材料の大きな表面に充分な量吸着する。

濃縮血漿誘導体の担体として適当な生物学的担体材料としては例えばコラーゲンかフィブリンである。ペンタファームとかホルモンヘミー社等が販売している「コラーゲンフリーズ」なる商標で市販されているコラーゲンスポンジやファイバー構造物は充分この目的に適する。ダスト状の粉末はかゝるスポンジに充分な量しつかりと吸着する。望ましくは担体材料の表面1平方センチメートル当り約0.5gの濃縮血漿誘導体を吸着せしめる。この様にして調製されたコラーゲンやフィブリンの毛状物は直接傷の治療に使用してもよいし応急包帯（粘着プラスター）の中に入れてもよい。

かゝる生物学的担体材料又は天然又は合成の創

傷手当材料の使用は反応表面を拡大し大きな創傷部位を被覆する助けとなる。

今一つの使い方は濃縮血漿誘導体を、之を溶かさぬ噴霧剤によつて吹きつけるのである。この目的のためには例えば100mmの真空乾燥した濃縮血漿誘導体、例えば上の実施例1に示した様な粉末状混合物、を10mmの懸濁剤中に懸濁したスプレーを使用する。例えば懸濁剤としてはエタノール／エーテル混合物（体積比でエタノール8部とエーテル2部の混合物）又は「フリーゲン114」を用いることができる。得られた懸濁物は分配カンにプランジャ式噴霧口をねじ込んだ容器につめる。

今一つの使用法は、濃縮血漿誘導体を含む泡製剤を使用することである。かゝる泡製剤を調製するには100mmの濃縮血漿誘導体、例えば上述の実施例3による粉末状混合物、を10mmの担体、例えば体積比で磷脂質1部とグリセリン9部の混合物、中に懸濁しこの懸濁物を通常の炭酸ガスボンベからとつた炭酸ガスにより発泡せしめる。

粉末状の血漿誘導物を霧化し或はスプレーの形で噴霧し又は発泡せしめることにより同製剤を接近することの困難な組織裂開部及び／又は孔部に導入することが可能となる。

本発明による濃縮血漿誘導体は固体状であるが故に湿気の無い処では非常に貯蔵安定性に優れ乾燥した無菌の状態であれば少く共2年間は保存出来しかもその生物活性は10パーセント以上低下しない。

組織裂開の閉止のための生物活性並びに止血フィブリン創傷被覆への転化は乾燥血漿誘導体が部分的に体液中に移行し体液中に溶けてから発現する。しかし短時間で例えば2分も経てば止血促進作用が既に現われる。創傷の閉止の生化学的コントロールはフィブリンノーゲン、フィブリン溶解抑制剤の増加によつて増大し且最適化される。血小板要素の添加は凝出する血液の凝固を刺激しそこに含まれる成長要素は創傷の治療を最適化する。

出血している傷口からは凝固可能な物質が出てくるが、その流出の勢により傷の界面から流れ出

てしまう。凝固可能な乾燥した粉体は局部的に凝固能力を増大せしめ液状物を吸収し血小板の固着を促進せしめる。創傷部位に露出して来たコラーゲンは、フィブリンの凝血を吸収し傷口閉止物質の吸着を増加せしめる。使用が乾燥状態で行われるので、特別な貯蔵方法或はトロンビンとの混合は不要である。又スプレーの形にして使用すると、皮膚の片の閉塞や手術用縫合糸の保護或は漏出性の出血を防ぐことが容易になる。

代理人 三 宅 正 夫

他 1 名

第1頁の続き

⑤Int. Cl. ³	識別記号	庁内整理番号
//A 61 K 35/30		7138-4C
37/12		7138-4C

優先権主張 ②1981年12月18日③欧州特許機構(E P)④81110615.2